

摘要

梨膏是以梨汁为主要原料经较高温、较长时间熬制而成的中药方剂，被认为具有比梨汁更好的止咳、化痰、润肺等功效，是很多人家里常备的止咳膏方。但截至目前，梨汁熬制成膏的过程仅凭师傅的经验控制，有较大的随意性，梨膏中起止咳润肺作用的关键活性成分及含量尚不明确，优化熬制工艺以增加功效成分的研究更少。考虑到梨汁中含有较高浓度的还原糖及氨基酸，梨膏熬制过程中、特别是熬制后期的操作条件符合美拉德反应的要求，因此推测梨膏熬制过程可能会生成美拉德反应初期产物[主要是梨汁中的优势氨基酸天冬氨酸所对应的 Fru-Asp (1-脱氧-1-L-天冬氨酸-D-果糖)]，而这种产物可能对梨膏的止咳有贡献。为此，本文系统开展了模拟状态下 Fru-Asp 的水相制备、分离纯化及结构鉴定，梨膏中 Fru-Asp 等 Amadori 化合物含量检测方法建立，Fru-Asp 止咳、润肺评价及梨膏熬制工艺的精确调控（以提高 Fru-Asp 含量）等内容。主要研究内容及结论如下：

(1) 研究梨膏加工过程营养成分及抗氧化性变化。结果表明：梨中同时存在还原糖、氨基酸、黄酮、总酚、维生素 C 等化学成分。加热过程浓缩梨汁的抗氧化能力整体呈升高趋势，黄酮、总酚、维生素 C 这些物质本身具有抗氧化活性，但加热后含量下降，说明这三种物质不是梨膏加热后抗氧化活性增强的因素。同时，浓缩过程梨汁中的还原糖、蛋白质含量下降，Amadori 化合物和 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 含量持续升高，表明发生了美拉德反应，其产物有利于梨膏抗氧化能力的提高。梨膏中 Amadori 化合物含量约占梨膏干重的 0.62%-1.38%，而黄酮含量约占 0.01%-0.09%，总酚含量约占 0.03%-0.15%。

(2) 模拟状态下制备、分离、纯化 Fru-Asp 并验证其化学结构，在此基础上建立梨膏中 Fru-Asp 等 Amadori 化合物的检测方法。在水相体系中以天冬氨酸单钾盐和葡萄糖为反应物，在适当温度、pH 值下反应，利用 Dowex 50WX4 氢型离子交换树脂分离纯化，同时氢离子取代钾离子，得到含有 Fru-Asp 的洗脱液。进一步分离后将只含有 Fru-Asp 的洗脱液冷冻干燥，得到固体粉末，再进行结构表征。结果表明：在水相体系中成功合成了 Fru-Asp，得率 38.58%，通过超高效液相串联四极杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 与核磁共振 (NMR) 鉴定：确定为 Fru-Asp，即 1-脱氧-1-L-天冬氨酸-D-果糖 ($C_{10}H_{17}NO_9$, MW: 295)，纯度达到 96%。以合成的 Fru-Asp 为标准品，在课题组前期合成 12 种 Amadori 化合物基础上，建立 13 种 Amadori 化合物的检测方法，测得梨膏中 Fru-Asp 占总 Amadori 化合物的 47.8%-56.7%。同时建立有害物质 5-HMF 和丙烯酰胺的检测方法，丙烯酰胺在梨膏中未检出。

(3) 证明 Fru-Asp 抗氧化能力、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制活性、止咳能力、缓解肺部炎症能力。结果表明：Fru-Asp 具有一定的自由基清除能力、氧化自由基吸收

能力和还原能力, Fru-Asp 浓度在 0-10 mg/mL 时抗氧化能力与浓度呈现正相关。Fru-Asp 浓度为 0.245 mM 时, ACE 抑制率为 50%, 具有抑制 ACE 活性的潜能。建立氨水致咳小鼠模型, 发现给药 Fru-Asp 能显著延长小鼠咳嗽潜伏期, 降低咳嗽的次数。脂多糖 (LPS) 诱导小鼠急性肺损伤实验中, 给药 Fru-Asp 可以减轻小鼠肺水肿程度和减少炎症因子的分泌。由此表明, Fru-Asp 具有较好的镇咳作用和缓解肺部炎症作用。

(4) 梨膏工艺调控。以富集梨膏中有益的 Amadori 化合物和减少潜在有害的 5-HMF 为目标, 进行单因素实验及正交试验, 考察水分活度、保温温度、保温时间对梨膏加工过程的影响。结果表明: 最佳工艺为水分活度 0.747, 保温温度 90℃, 保温时间 5 h, 此工艺下梨膏中 Amadori 化合物总量为 13.31 mg/g, 5-HMF 含量 1.53 mg/100 g。自制梨膏与其他市售梨膏相比, Amadori 化合物、抗氧化能力显著高于市售梨膏, 5-HMF 低于市售梨膏, 感官品质无明显差异。与空白组相比, 给药自制梨膏的小鼠咳嗽潜伏期显著延长, 咳嗽次数显著减少, 酚红排泌量显著增加, 表明具有良好的止咳祛痰效果。

关键词: 梨膏; Amadori 化合物; Fru-Asp; 止咳润肺; 工艺调控

Abstract

Pear syrup is a traditional Chinese medicine prescription made from pear juice as the main raw material and boiled for a long time at high temperature. It is considered to have better cough relieving, expectorant, lung moistening, and other effects than pear juice. It is a commonly used ointment in many households. However, up to now, the process of making pear syrup is only controlled by the experience of the master, with greater randomness. The key active ingredients and content of pear syrup which play the role of relieving cough and moistening lung are still mysterious, and there are fewer studies on optimizing the boiling process to increase the efficacy of ingredients. Considering that pear juice contains relatively high concentration of reducing sugars and amino acids, the operating conditions during pear syrup steaming period, especially in the later period, meet the requirements of Maillard reaction, we speculate that the initial products of Maillard reaction may be formed during pear syrup heating process (mainly Fru-Asp[N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) aspartic acid], the dominant amino acid in pear juice). Therefore, this study systematically carried out preparation, separation and purification of Fru-Asp and structure identification, and established detection methods for Amadori compounds such as Fru-Asp in pear syrup. The evaluation of cough relieving and lung moistening by Fru-Asp and the precise control of pear syrup boiling technology (to improve Fru-Asp). The main research contents and conclusions are as follows:

(1) The content of nutritional composition and antioxidant activities in pear syrup during steaming period was studied. The results showed that there were reducing sugars, amino acids, flavonoids, total phenols, vitamin C and other chemical components in pear, and the antioxidant capacity showed an increasing trend during the concentration process. Flavonoids, total phenols and vitamin C showed a downward trend, which indicated that these components were not the factors for the enhancement of antioxidant activity of pear syrup after heating. The content of reducing sugar and protein decreased, and the content of Amadori compound and 5-HMF increased continuously, indicating that Maillard reaction occurred during the heating process, and the reaction products contributed to the antioxidant capacity of pear syrup. The content of Amadori compounds accounted for about 0.62% to 1.38% of the dry weight of pear syrup, while flavonoids accounted for 0.01% to 0.09% and total phenol accounted for about 0.03% to 0.15%.

(2) Preparation, separation and purification of Fru-Asp, and verification of its chemical structure in the simulated state. On this basis, the detection method of Amadori compounds such as Fru-Asp in pear syrup was established. In aqueous system, aspartic acid potassium salt

and glucose were used as reactants at ambient temperature and pH value. Dowex 50WX4 Hydrogen ion exchange resin was used to separate and purify, and hydrogen ion replaced potassium ion to obtain the eluent containing Fru-Asp. After further analysis, the eluent containing only Fru-Asp was freeze-dried to obtain solid powder, and then the structure was characterized. The results showed that Fru-Asp was successfully synthesized in aqueous system with a yield of 38.58%. Its purity and structure were identified by UPLC-Q-TOF-MS and NMR. The purity reached 96% and was determined to be Fru-Asp, that is, N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) aspartic acid ($C_{10}H_{17}NO_9$, MW: 295). Based on the 12 Amadori compounds synthesized by our research group, 13 Amadori compound detection methods were established. The results showed that Fru-Asp in pear syrup accounted for 47.8%-56.7% of the total Amadori compounds. Meanwhile, the determination methods of 5-HMF and acrylamide were established. Acrylamide was not detected in pear syrup.

(3) The antioxidant activity, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity, cough relieving ability and lung inflammation relieving ability of Fru-Asp. The results showed that Fru-Asp had certain free radical scavenging capacity, oxidative radical absorption capacity and reducing capacity. The antioxidant capacity was positively correlated with Fru-Asp concentration at 0-10 mg/mL. When concentration of Fru-Asp was 0.245 mM, the inhibition rate of ACE was 50%, indicating that Fru-Asp had the potential to inhibit ACE activity. Fru-Asp could prolong the cough latency of mice induced by ammonia water and reduce the number of coughs within 2 min. In the experiment of LPS induced acute lung injury in mice, Fru-Asp can reduce the degree of pulmonary edema and the secretion of inflammatory factors. These results indicated that Fru-Asp has antitussive effect and ability to alleviate lung inflammation.

(4) Process control of pear syrup: To enrich beneficial Amadori compounds and reduce potentially harmful 5-HMF in pear syrup, single factor experiment and orthogonal experiment were conducted to investigate the effects of water activity, temperature and time on pear syrup processing. The results showed that the optimal process was water activity 0.747, temperature 90°C, time 5 h, the total amount of Amadori compound was 13.31 mg/g, the content of 5-HMF was 1.53 mg/100 g. Compared with other commercial pear syrup, self-made pear syrup had significantly higher content of Amadori compounds and antioxidant capacity, and content of 5-HMF was lower. There was no significant difference in sensory quality. In addition, self-made pear syrup could significantly prolong the cough latency, reduce the cough times, and increase the amount of phenol red excretion. It showed that the self-made pear syrup has the effects of relieving cough and resolving phlegm.

Keywords: pear syrup, Amadori compounds, Fru-Asp, antiussive and moisten the lungs, process regulation

目 录

1 绪论.....	1
1.1 梨汁与梨膏.....	1
1.1.1 梨汁与梨膏营养成分.....	1
1.1.2 梨汁与梨膏功能性.....	2
1.2 梨膏制备过程成分变化.....	2
1.2.1 梨膏的功能成分及变化.....	2
1.2.2 梨膏制备与美拉德反应.....	3
1.2.3 梨膏的加工及调控手段.....	4
1.3 梨膏制备与品质提升研究中的其他问题.....	4
1.3.1 梨膏功效成分的确定.....	4
1.3.2 止咳祛痰研究方法.....	6
1.3.3 润肺研究方法.....	7
1.4 立题背景与意义.....	7
1.5 主要研究内容.....	8
2 材料与方法.....	9
2.1 材料与设备.....	9
2.1.1 材料与试剂.....	9
2.1.2 实验动物.....	9
2.1.3 仪器与设备.....	9
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 梨膏营养成分检测.....	10
2.2.2 Fru-Asp 的制备与结构鉴定.....	12
2.2.3 Fru-Asp 功能性研究.....	13
2.2.4 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺检测方法的建立.....	15
2.2.5 梨膏制备工艺的优化.....	17
2.2.6 成分检测与性质分析.....	18
2.2.7 数据分析.....	19
3 结果与讨论.....	20
3.1 梨膏营养成分检测与功能性分析.....	20
3.1.1 梨汁中的营养成分.....	20
3.1.2 梨汁浓缩过程营养成分变化.....	21
3.1.3 梨汁浓缩过程抗氧化活性变化.....	25
3.2 Fru-Asp 合成、纯化与鉴定.....	25
3.2.1 Fru-Asp 的合成与纯化.....	25

3.2.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析 Fru-Asp.....	27
3.2.3 NMR 分析 Fru-Asp	28
3.3 Fru-Asp 的功能性	29
3.3.1 抗氧化性.....	29
3.3.2 ACE 抑制活性.....	31
3.3.3 止咳功能.....	32
3.3.4 缓解肺部炎症功能.....	32
3.4 13 种 Amadori 化合物测定方法的建立	34
3.4.1 UPLC-MS/MS 测定方法	34
3.4.2 方法学验证.....	35
3.4.3 梨膏产品中 Amadori 化合物的检测	35
3.5 高 Amadori 化合物含量梨膏的工艺研究	36
3.5.1 水分活度对梨膏中 Amadori 化合物总量的影响	36
3.5.2 不同保温温度对梨膏中 Amadori 化合物总量的影响	38
3.5.3 不同保温时间对梨膏中 Amadori 化合物总量的影响	38
3.5.4 优化后的制备工艺及验证.....	39
3.6 产品评价.....	40
3.6.1 功能成分比较.....	40
3.6.2 抗氧化性比较.....	40
3.6.3 成分与抗氧化性的相关性分析.....	41
3.6.4 感官评价.....	42
3.6.5 止咳祛痰能力评价.....	42
主要结论与展望	44
主要结论.....	44
展望.....	45
参考文献.....	46

主要缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride	2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)	2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸
ACE	Angiotensin converting enzyme	血管紧张素转化酶
Asp-K	Potassium L-aspartate	L-天冬氨酸钾
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	肺泡灌洗液
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	1,1-二苯基-2-三硝基苯肼
Fru-Ala	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) alanine	1-脱氧-1-L-丙氨酸-D-果糖
Fru-Arg	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) arginine	1-脱氧-1-L-精氨酸-D-果糖
Fru-Asp	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) aspartic acid	1-脱氧-1-L-天冬氨酸-D-果糖
Fru-Glu	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) glutamic acid	1-脱氧-1-L-谷氨酸-D-果糖
Fru-Gly	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) glycine	1-脱氧-1-L-甘氨酸-D-果糖
Fru-His	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) histidine	1-脱氧-1-L-组氨酸-D-果糖
Fru-Leu	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) leucine	1-脱氧-1-L-亮氨酸-D-果糖
Fru-Met	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) methionine	1-脱氧-1-L-甲硫氨酸-D-果糖
Fru-Phe	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) phenylalanine	1-脱氧-1-L-苯丙氨酸-D-果糖
Fru-Pro	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) proline	1-脱氧-1-L-脯氨酸-D-果糖
Fru-Ser	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) serine	1-脱氧-1-L-丝氨酸-D-果糖
Fru-Thr	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) threonine	1-脱氧-1-L-苏氨酸-D-果糖
Fru-Val	N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) valine	1-脱氧-1-L-缬氨酸-D-果糖
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry	高效液相-质谱联用色谱
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity Capacity	氧化自由基吸收能力
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	2,3,5-三苯基氯化四氮唑
UPLC-Q-TOF-MS	Ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer	超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪
5-HMF	5-Hydroxymethyl furfural	5-羟甲基糠醛

1 绪论

1.1 梨汁与梨膏

梨是一种具有食疗价值的水果，营养丰富、口味甘甜，果实形状近圆柱形，果皮为绿黄色或黄色，果肉为白色，有石细胞^[1]。据我国药典《本草从新》记载，“梨，性甘寒，微酸，具有清心润肺，利大小肠，止咳消痰，清喉降火，除烦解渴，润燥消风，醒酒解毒等功效”^[2]。梨加工产品有很多，如梨汁、梨膏、梨醋、梨糖水罐头、梨干和梨果脯等^[3-6]。由于消费者对润肺养生需求日益增加，使得梨汁与梨膏产品在市场上活跃起来，尤其是梨膏，历史悠久，营养价值高，深受国内外消费者喜爱^[7]。

梨汁是鲜梨榨汁，复配蜂蜜、冰糖而成的纯天然果汁饮料，口感微酸，近几年在我国果汁出口量稳居第二位，占我国出口果蔬汁总量的 6%-8%^[8]。梨膏则是我国一道传统的宫廷药膳及保健佳品，是将梨汁长时间熬煮浓缩，还可以添加萝卜、藕节、贝母、蜂蜜、麦冬、姜汁等药食同源材料，制成具有止咳、祛痰、生津、润肺保健功效的膏滋产品^[9, 10]，例如秋梨润肺膏、雪梨止咳糖浆、雪梨蜜炼枇杷膏等，是很多人家秋冬季节常备的止咳膏方。

1.1.1 梨汁与梨膏营养成分

梨汁由梨榨汁、复配而成，加工过程只有少量纤维素减少，能保留鲜果中的各种营养成分^[11]。梨含水含糖量多，含水量约 80%-90%，根据《中国食物成分表标准版》第 6 版记载，每 100 g 梨果肉含蛋白质 0.1 g-0.9 g，脂肪 0.1 g-0.3 g，碳水化合物 10.6 g-20.2 g，维生素 C 1 mg-11 mg，钙 2 mg-12 mg，磷 6 mg-18 mg，铁 0.2 mg-0.9 mg^[12]。另外梨含有微量的芳香成分、色素、有机酸和酚类物质^[13]，如熊果苷^[14]、儿茶素、绿原酸、槲皮素等。《中国食物成分表标准版》显示不同梨之间的营养成分含量差别不大，适用于制作梨膏的砀山梨、雪花梨和莱阳梨蛋白质含量相当。

梨膏是梨经过榨汁、过滤、熬煮等工艺加工制成的，可溶性固形物达到 70%以上。梨榨汁、加热之后，维生素 C 容易氧化分解，酚类化合物也容易发生降解^[15]。董雪君等人^[16]提出梨膏中主要营养成分有酚类物质、黄酮类物质、三萜类物质，同时梨汁在熬制过程时发生美拉德反应，美拉德产物使产品抗氧化能力提高。因此梨膏加工过程中，梨汁原有营养物质的含量会有所改变，还会产生新的功能成分，如美拉德反应产物，而这些产物对梨膏的影响未知。

QBT5456-2019《梨汁及梨汁饮料》^[17]对梨汁的质量标准做出了规定，T/AHFIA 037-222《砀山梨膏》^[18]规定了砀山梨膏的质量要求。表 1-1 列出了标准中梨汁及梨膏的部分理化指标，梨膏与梨汁相比，主要不同点在于可溶性固形物以及酚类物质，梨

汁标准规定熊果苷含量 ≥ 100 mg/kg, 梨膏标准规定原儿茶酸 ≥ 10 mg/kg, 梨膏对酚类物质的要求降低了十倍, 说明梨膏加工过程中酚类物质会损失, 所以梨膏的活性物质可能在于熬制过程中新形成的营养成分。

表 1-1 标准中梨汁及梨膏的理化指标

Tab. 1-1 Physical and chemical indexes of pear juice and pear syrup in the standard

项目	梨汁	梨膏
可溶性固形物 (20°C折光法计) / (%)	≥ 11.0	≥ 70
总酸 (以柠檬酸计) / (g/100 g)	≥ 0.1	0.3-2.0
酚类物质 / (mg/kg)	熊果苷 ≥ 100	原儿茶酸 ≥ 10

1.1.2 梨汁与梨膏功能性

梨汁的功能性来源于原料梨中的营养成分, 梨中富含糖分、维生素, 还含有多酚类物质, 如原儿茶酸、绿原酸等, 这些多酚类物质的结构中有酚羟基, 对活性氧等自由基具有较强的捕捉能力, 从而能减少或阻止组织中氧化反应的进行^[19], 此外维生素 C 也具有抗氧化性, 表明梨汁具有抗氧化作用。梨中还含有抗炎成分, 梨提取物中的熊果酸、 β -谷甾醇、齐墩果酸以及胡萝卜苷有抗炎作用, 对二甲苯诱导小鼠炎性肿胀起抑制作用^[7]。梨中的维生素还具有降低血压、缓解疲劳等功效, 但是梨汁中含水量较多, 发挥功效的成分含量甚微。

梨膏是一种传统的膏滋产品, 作为止咳平喘的佳品从古至今被广泛应用, 无论中药西药, 膏滋吸收最为迅速完全, 并且浓缩精华。梨膏由梨汁长时间熬煮而成, 浓缩了梨汁当中的营养物质, 功效强于梨汁, 还能解决梨滞销问题, 节约运输成本。《本草求原》中提到梨具有润肺、清热、解酒毒功效, 熬膏效果更好。目前不少学者通过动物实验验证了梨膏产品的止咳祛痰能力, 李继洪等人^[20]选取了多种实验动物进行实验, 小鼠进行氨水引咳实验、二氧化硫引咳实验、酚红祛痰实验、耳廓肿胀实验, 大鼠进行毛细管排痰实验和解热实验, 豚鼠采用整体平喘实验, 对家兔进行解热实验, 全面验证梨膏的镇咳、祛痰、抗炎、解热、平喘功能。

1.2 梨膏制备过程成分变化

梨汁与梨膏功能性不同的背后, 值得对梨膏加工过程成分的变化进行探究。许多研究表明, 水果及其加工产品对健康的益处, 来源于抗氧化物质, 例如维生素 C、类胡萝卜素、多酚类物质等^[21]。然而, 在加工过程中发生的物质变化和新形成的成分也会影响产品的功能, 值得探索。

1.2.1 梨膏的功能成分及变化

水果加工过程物质变化有三种可能性: (1) 由于细胞壁和亚细胞室的热破坏而释

放大量的抗氧化成分，或者破坏了抗氧化成分与蛋白/多糖之间的复合物形态，使其更易消化吸收，进而大大提高其生物利用率^[22, 23]；（2）热敏性物质如维生素 C 和其他酚类物质的损失^[24]；（3）产生新的非营养抗氧化剂或形成具有抗氧化活性的新化合物，如具有抗氧化活性的美拉德反应产物^[25]。

梨膏加工过程包括清洗、压榨、过滤、浓缩等，加工过程一方面浓缩各种有效功能成分，另一方面会损失部分抗氧化成分。Jiang 等人^[26]的研究表明，与新鲜梨相比，浓缩后梨汁总酚和黄酮含量分别显著降低了 53.11%和 46.47%，主要是在压榨过程中损失。曹虹等人^[11]发现真空加热浓缩过程中总酚、黄酮、维生素 C 含量下降明显，原因是黄酮类、酚类化合物对光、热的稳定性较差，梨膏需高温加热浓缩，导致含量降低^[27]。

梨中含有大量可溶性糖，主要有葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖、棉子糖及水苏糖，其中葡萄糖和果糖含量占比最高，其次是蔗糖^[28]。孙珊珊等人^[29]发现随着浓缩温度的升高，梨浓缩汁中还原糖含量和氨基态氮含量下降，推测是由于部分还原糖和氨基酸参加了美拉德反应。梨中还含有多种氨基酸，杨毅等人^[30]测定出浓缩砀山酥梨汁中含有 14 种游离氨基酸，主要是天冬氨酸，其次是谷氨酸和丙氨酸，在 37℃和 50℃温度下贮存时，氨基酸的损失增加，浓度下降最多的是天冬氨酸，可以推测，损失的氨基酸与还原糖发生美拉德反应。

目前研究表明能发挥镇咳祛痰功效的功能物质有芹糖甘草苷、生物碱、槲皮素、黄酮、芦丁、原儿茶酸等^[31-33]，这些功能物质具有抗炎抗氧化作用，蒋馨等人^[34]认为柿叶的润肺镇咳功效可能与槲皮素有关，也与黄酮、芦丁、槲皮素、山奈酚的抗菌抗炎作用有关，从而缓解肺部炎症。Dela Cruz 等人^[35]对菲律宾的一种治疗咳嗽的蕨类植物的成分和抗氧化活性进行了研究，认为止咳作用可以归因于植物的高抗氧化活性，提取物含有酚类化合物，可抑制促进炎症的弹性蛋白酶活性。梨膏中的抗氧化活性物质能够降低自由基等过氧化物对人体的损害，因此推测其能够降低肺部气道炎症应答，对人体起到保护作用，发挥镇咳化痰的功效，在梨汁的加工过程中，这些物质发生了改变，导致了梨膏与梨汁在功效上的差异。

1.2.2 梨膏制备与美拉德反应

梨膏熬制过程颜色逐渐变深，最终呈现琥珀色或棕褐色，是美拉德反应的特征颜色。梨中含有丰富的还原糖和氨基酸，提供了反应物，加热熬煮过程梨汁水分蒸发，水分活度降低，适宜的水分活度和温度为美拉德反应提供了反应条件。美拉德反应是一种非常重要的、在食品工业中广泛存在的化学反应。美拉德反应是从羰基与氨基反应开始，会产生多种复杂的产物，可以分为三个阶段。首先，还原糖与氨基酸或蛋白质发生羰氨反应生成席夫碱，继而发生环化，经 Amadori 重排生成 Amadori 化合物，经过一系列复杂的化学反应，产生大量的有色物质，包括芳香醛、酮、胺等，同时也产生一些其他产物，如丙烯酰胺、羟甲基糠醛（5-HMF）等^[36]。Amadori 化合物是在早期

变化形成的，它们的测定为早期美拉德反应引起的质量变化提供了一个非常敏感的指标，很多食品加工开始关注于 Amadori 化合物的检测，例如番茄粉/酱、辣椒粉、黑蒜等，特别是干制的果蔬中^[37,38]。Amadori 化合物具有强极性、亲水性特质，大多数无明显的紫外可见吸收和荧光产生，高效液相色谱-串联质谱法以其灵敏、高效等优点，成为 Amadori 化合物检测方法中应用最为广泛的一种方法^[39]。

美拉德反应会对梨膏的风味、色泽以及营养成分带来影响，赋予梨膏焦香味以及所期望的色泽，由于食品中氨基酸种类不同，都有可能形成 Amadori 化合物，因此建立梨膏体系中多种 Amadori 化合物同步测定的方法，控制梨膏加工过程美拉德反应尤为重要。

1.2.3 梨膏的加工及调控手段

梨膏制作方法简单，传统工艺为先将梨切成块状或条状，直接榨汁或者加水煮沸后榨汁，再过滤并开始缓慢加热，先大火浓缩，根据经验在临近终点时，小火收膏。过程中没有特定的工艺流程及参数，加热时间和温度根据经验和实际操作决定，有经验的工人会根据梨膏稠度、可以挂勺、拉丝长、滴水成珠的现象判断熬煮终点，如果加工时间过长，梨膏会产生焦糊味，导致营养物质分解并产生致癌物质，如丙烯酰胺、5-HMF 等。虽然 5-HMF 被证实具有一定的功能性，但在高剂量下也存在潜在的肾毒性、致癌性和遗传毒性。关于梨膏加工工艺调控以及工艺优化的研究，目前主要以透光率、色度或营养成分为指标，从而得到符合感官要求的梨膏。杨冰峰^[40]以安梨为原料，以透光率、亮度、可溶性固形物含量、总酚、黄酮为指标，优化了安梨膏的工艺。但目前尚未有对梨膏熬制过程中营养功能成分变化进行研究，特别是美拉德产物对梨膏功能的作用。

梨膏浓缩过程发生美拉德反应，导致氨基酸和还原糖成分减少，生成相应的美拉德产物，美拉德前期产物不仅能产生特殊香气，还具有一定的功能性，而末期产物如丙烯酰胺和杂环胺却存在潜在危害。因此梨膏加工过程需要对美拉德反应进行调控，美拉德反应受多种因素的影响，除反应底物的种类之外，还有温度、水分活度、时间、pH 值、金属离子等外界因素^[41]。在果蔬加工中，可以通过调控工艺参数，控制美拉德反应进程，温度、pH 值升高都能加速美拉德反应^[42]，水分活度过高或过低均不利于美拉德反应发生，最适水分活度约为 0.5-0.8^[43]。因此在梨膏加工过程中，可以通过以富集有益的美拉德产物为目标，对温度、时间等工艺参数进行调控，从而提高梨膏质量。

1.3 梨膏制备与品质提升研究中的其他问题

1.3.1 梨膏功效成分的确定

梨膏被认为可以提高梨的功效，是一种有止咳、润肺、改善便秘、利肠解毒功效的传统民间药物。目前对梨及其产品的成分检测主要是多酚类化合物，Li 等人^[44]指出，

梨的提取物中，三萜类化合物以及黄酮类化合物具有良好的抗炎和抗菌作用，但是梨膏中在浓缩过程中这类化合物易氧化分解，含量并不高，梨膏的主要特征成分及其治疗效果的研究仍然有限。

近年来，在氨基酸、多肽或蛋白质与还原糖在加热过程中发生的美拉德反应受到了研究人员的广泛关注^[45]。特别是在中药炮制过程中，炒和炮都需要加热，会使药物色泽和风味变化，例如鸡内金炒后、麦芽炒后、熟地黄炮制后和何首乌炮制后颜色变深，都可能是美拉德反应的结果^[46, 47]。研究发现，梨膏中氨基酸和还原糖在加热浓缩过程中含量发生了显著变化，表明发生了美拉德反应，且浓缩后抗氧化能力较浓缩前提高，这可能与美拉德反应产物的生成有关^[16]。一些研究显示，美拉德反应产物可能导致多种慢性疾病，也有其他研究表明美拉德反应产物具有功能性，包括抗氧化活性、抗炎作用和抗菌活性^[48-52]。

Amadori 化合物是美拉德反应初期相对稳定的产物，果蔬热加工过程的美拉德反应引起了国内外学者的广泛关注，已在番茄粉、黑蒜、洋葱汁、辣椒粉等产品中检测出 Amadori 化合物^[37, 53]，并证明其具有一定的生理活性，包括抗氧化活性、抗炎能力、抑制血管紧张素转化酶（ACE）活性、金属离子螯合作用等^[38, 54]。

(1) 抗氧化能力：Amadori 化合物还原电位高，能提供电子或 H 原子，所以容易与氧化自由基和氧化剂反应，产生中和的自由基，促进非自由基形式生成，表现出还原能力^[55]，从而具有抗氧化性。此外，Amadori 化合物还可以螯合铜或铁等金属离子， Fe^{2+} 是食品中常见的引起氧化的重要因素，崔和平^[56]的研究发现 Amadori 化合物有与 Fe^{2+} 螯合的位点，具有 Fe^{2+} 的螯合能力，从而减少脂质氧化。Kenjiro 等人^[57]在老化大蒜的提取物中分离出 Fru-Arg，并发现 $50 \mu\text{mol/L}$ Fru-Arg 能完全清除过氧化氢， $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度时清除 37%过氧化氢，其抗氧化活性与抗坏血酸相当。与此同时，许多产品加工过程抗氧化活性的增加都与 Amadori 化合物含量的增加相关。Mossine 和 Mawhinney^[58]发现番茄粉中 Fru-His 能螯合铜离子，具有抗氧化能力。含有丰富 Amadori 化合物（Fru-Arg, Fru-Met）的黑大蒜提取物比生大蒜提取物具有显著更高的抗氧化能力^[59]。此外，合成的 Amadori 化合物 Xyl-Phe 在 $0.2-1.2 \text{ mg/mL}$ 的浓度下对脂质过氧化有抑制作用，同时有 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除活性^[60]。Feng 等人^[61]发现美拉德反应是提高虾副产品蛋白水解物的细胞抗氧化活性的潜在方法，虾副产品水解蛋白与葡萄糖反应的美拉德产物对人 HepG2 细胞氧化应激的抑制作用强于虾副产品水解蛋白。

(2) 降低血压能力：Amadori 化合物能与酶活性中心上的金属离子螯合，使其活性下降甚至失活，例如血管紧张素转化酶 (ACE)，ACE 酶活性的增强会导致血压升高，引起高血压，控制 ACE 酶活性是高血压治疗的重要方式。Zhou 等人研究了 Fru-His 对 ACE 的抑制活性及其作用机制，证明 Fru-His 具有良好的 ACE 抑制作用。根据酶抑制动力学分析，Fru-His 是一种竞争性抑制剂，Fru-His 通过氢键连接 ACE，并与活性位点

上的锌离子相互作用^[62]。

(3) 抗炎能力：在体内和体外的研究中，美拉德产物被证明可以调节炎症反应和抑制细胞凋亡。Oh 等人^[54]报道，在 DSS 诱导的结肠炎模型中，Amadori 化合物降低了巨噬细胞中 TNF- α 的产生，并下调了 Caco-2 细胞中 IL-8 和 IL-1 β 的 mRNA 表达。Zhou 等人^[63]研究 Fru-Arg 对脂多糖刺激的小鼠 BV-2 小胶质细胞的抗氧化和神经炎症反应的作用。数据表明，Fru-Arg 可以显著抑制脂多糖诱导的小鼠 BV-2 小胶质细胞中一氧化氮的产生，同时调节与氧化应激相关的多种蛋白靶点的表达，减弱脂多糖刺激的 BV-2 细胞的神经炎症反应。

果蔬制品中都含有丰富的还原糖和氨基酸，但是氨基酸种类不同，对应的 Amadori 化合物种类及功能也不同，研究表明，天冬氨酸具有镇咳平喘作用^[64]，梨膏加工过程氨基酸参与美拉德反应，含量降低，但梨膏的止咳祛痰能力更被认可，因此天冬氨酸对应的 Amadori 化合物是否能增强梨膏抗氧化活性以及缓解咳嗽、缓解肺部炎症能力值得进一步探究。

1.3.2 止咳祛痰研究方法

咳嗽是人体的一种保护反应，咳嗽时会把肺部的空气、粘液、细小灰尘等异物排出体外，促进气道清除，咳嗽的同时常常会伴有咳痰，将异物随痰液排出。秋冬季节，天气干燥，流感易发，往往有咳嗽症状，影响工作、学习、睡眠，消耗体力^[65]。咳嗽的治疗方式主要分为两类，对因治疗指针对咳嗽的原发病进行治疗，如变异性哮喘、急性上呼吸道感染等；对症治疗是指缓解咳嗽症状进行治疗，有一些咳嗽病人并没有明显诱因，可以用对症治疗^[66]。

镇咳药物主要分为减少咽部咳嗽感受器刺激的药物、抗生素、抗炎药物、中枢性镇咳药^[67]。止咳糖浆、喉片或蜂蜜等通过“包裹”喉咙的咳嗽感受器而具有镇咳作用，糖浆比胶囊或片剂更有效。抗生素、抗炎药物是对由细菌和内源性炎症介质和分泌物引起的咳嗽的因果治疗。中枢性镇咳药如可待因，主要是通过与其脑干咳嗽中枢的受体结合来实现的咳嗽调节，但副作用风险较高。梨膏等糖浆类药物可以减少咽部咳嗽感受器刺激，无副作用，效果较好，值得进一步研究。

为开发镇咳药物，多采用咳嗽动物模型作为研究工具。犬、猫、猪等大动物可用于建立咳嗽模型，但筛选药物时耗费大，大鼠、小鼠、豚鼠等小型动物也可用于建立咳嗽模型，且成本低，宜用于大批量筛选实验。诱发咳嗽的方法有机械刺激、化学刺激、电刺激等^[68]。镇咳实验常采用小鼠氨水引咳法和二氧化硫引咳法，都属于化学刺激法，其中氨水引咳法通过吸入氨气刺激呼吸道感受器，引起咳嗽，具有现象明显、成本低廉且简单可行的优点，比二氧化硫引咳法使用硫酸更安全，常被国内外学者使用于止咳药效实验中^[20, 69]。

酚红排泄法是模拟人体排痰量的经典方法，酚红经注射部分被吸收进气道内，吸收量随痰液分泌量增多而增多，分泌量越多，说明痰液稀释更易被排出，呼吸道分泌

的增多还有利于保护表面黏膜过多暴露的咳嗽感受器，达到减少咳嗽的目的，因此酚红排出量可作为评价祛痰强弱的指标^[70]。

1.3.3 润肺研究方法

肺喜湿恶燥，所以秋季燥邪最容易伤害到肺脏，轻则干咳少痰，重则痰中带血，因此在秋天应以养肺润肺为先。肺是与外界进行氧气交换的脏器，肺部炎症易使气道暴露过多的咳嗽感受器，为咳嗽发生提供有利条件^[71]，同时，也会使痰液黏稠，不易咳出，导致频繁咳嗽。因此润肺研究主要体现在缓解肺部炎症上，炎症减轻后，才有利于清肺润肺。

炎症主要有感染和组织损伤两种诱因，目前常采用脂多糖（LPS）诱导急性肺损伤的动物模型，肺部炎症引起的炎症因子增加、肺泡结构破坏为特征，研究药物对于肺部炎症的缓解情况^[72]。致炎因子主要有 TNF- α 、IL-6、PGE2，其中 TNF- α 可有效激活 IL-6、PGE2 等一系列细胞因子及炎性介质的产生，启动各组织炎症反应。研究发现许多药物通过直接或间接降低 TNF- α 与 IL-1 β 的含量或活性而具有抗炎能力^[73]，止咳药物可通过减少炎症因子的分泌、炎症细胞浸润，缓解肺部和气道炎症环境，减少咳嗽感受器刺激达到止咳的作用^[74]。Xiang 等人^[75]用 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠评估湖北贝母止咳、祛痰平喘作用，发现乙酸乙酯组分显著降低了支气管肺泡灌洗液的白细胞和中性粒细胞以及肺指数以及肺匀浆的促炎细胞因子（TNF- α 和 IL-6）。

1.4 立题背景与意义

梨膏是用梨（鸭梨，雪花梨，砀山梨等）长时间熬制而成的药膳饮品，具有生津止渴、祛痰止咳等功能，与梨汁相比被认为具有更好的功效。但梨膏中关键活性成分尚未有定论，质量评价方法缺少，梨膏中营养物质与止咳润肺功能的关系不清楚。

梨膏加工过程抗氧化能力增加，具有抗氧化性的总酚、黄酮、维生素 C 等成分含量下降，而加工中生成的美拉德产物对梨膏的功能有潜在的作用，目前很少有研究关注梨膏中美拉德产物对抗氧化的贡献。针对以上问题，为弄清梨膏中营养物质，确定最终产品评价方法，本文开展了梨膏基础营养成分研究及调控，旨在研究梨膏中不同营养成分与功能性的关系，拓宽对于梨膏中活性成分的认识。为探究美拉德反应对梨膏营养的作用，选择果蔬中被大量检测到且被证实具有功能性的 Amadori 化合物，合成梨膏中的特征 Amadori 化合物：Fru-Asp，并且探究 Fru-Asp 的功能性，包括抗氧化、抑制 ACE 酶活性、止咳能力和缓解肺部炎症方面的应用潜力，有望扩大 Amadori 化合物在炎症治疗中的应用范围。

建立 13 种 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺的检测方法，以增加 Amadori 化合物含量、减少有害物质 5-HMF 生成为目标，对梨膏加工进行工艺调控，使梨膏能最大限度生成并保留有效成分。将最优工艺制备的自制梨膏进行功能成分和功能性的检测，

并与市售梨膏进行比较。Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺的检测方法可以应用于梨膏及所有膏制产品，提高附加值，为膏制产品的加工及评价方法提供指导。

1.5 主要研究内容

(1) 梨膏浓缩过程营养成分及功能性质的检测。研究梨膏浓缩过程维生素 C、多酚、黄酮、还原糖、氨基酸、美拉德反应产物等营养物质含量变化，以及 4 种表征体外抗氧化性指标的变化，分析不同营养物质变化对梨膏抗氧化能力的贡献。

(2) Fru-Asp 的水相合成及功能研究。合成并纯化梨汁中特征氨基酸 Asp 对应的 Amadori 化合物，即 Fru-Asp，再通过超高效液相串联四极杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC-Q-TOF-MS) 与核磁共振 (NMR) 对 Fru-Asp 进行结构鉴定。从四种体外抗氧化性指标测试、抗 ACE 酶活性实验、动物实验等方面评估 Fru-Asp 抗氧化、抗 ACE 酶活性、止咳、润肺作用。

(3) 13 种 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺的定性定量检测。根据梨中氨基酸成分及含量比例，建立包含 Fru-Asp 在内、共 13 种 Amadori 化合物的 UPLC-MS/MS 定量检测方法，5-HMF 和丙烯酰胺也采用 UPLC-MS/MS 检测含量。利用该方法对 6 种市售梨膏中的 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺进行检测。

(4) 梨膏制备工艺的优化。提出分段式加工方式，通过调控水分活度、保温温度和保温时间，考察不同条件对梨膏中 Amadori 化合物和 5-HMF 含量的影响，实现 Amadori 化合物、5-HMF 的精准调控，通过正交试验得到梨膏加工最优工艺参数，制得含有高 Amadori 化合物和低 5-HMF 的梨膏，以提高梨膏品质、降低食用安全风险。

(5) 自制梨膏与市售梨膏的综合比较。比较自制梨膏和其他市售梨膏的功能成分 (总酚、黄酮、Amadori 化合物、5-HMF)、体外抗氧化能力和感官评分，结合相关性分析，证实梨膏不同于梨汁的关键有效成分为 Amadori 化合物。建立小鼠咳嗽模型考察自制梨膏的止咳能力，酚红排泌祛痰实验考察自制梨膏的祛痰能力。

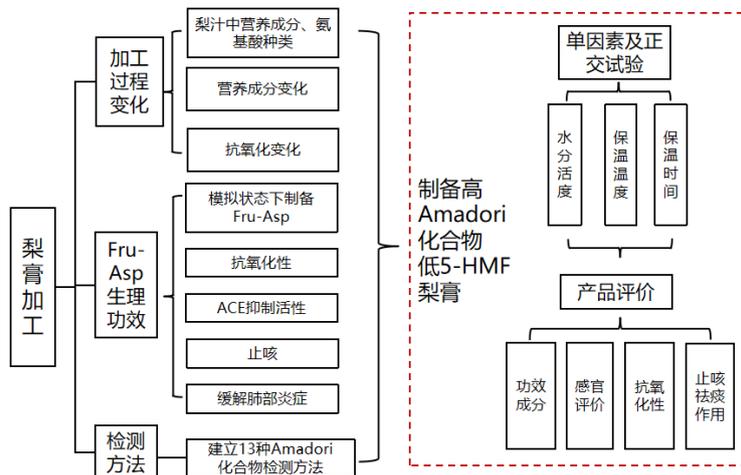


Fig. 1-1 Research technology route

2 材料与amp;方法

2.1 材料与amp;设备

2.1.1 材料与amp;试剂

砀山梨（中国安徽）购于无锡的超市；五种市售梨膏来自南京同仁堂、山东梨正元、山东昌荣食品、安徽譙兴堂、新疆汇康农业等公司。L-天冬氨酸钾（Asp-K）从北京伊诺凯公司（中国北京）购买。D- (+) -无水葡萄糖（Glc）、L-天冬氨酸（Asp）、铁氰化钾、氯化铁、磷酸二氢钾、磷酸氢钠、三氯乙酸、乙腈、苯酚红等购于国药化学试剂有限公司（中国上海）。血管紧张素转化酶（ACE, EC3.4.15.1, 来源于兔肺），LPS（脂多糖，大肠杆菌 0111: B4）和地塞米松购于 Sigma-Aldrich 公司（美国）。Dowex 50WX4 氢型离子交换树脂（200-400 目）购于上海百灵威科技有限公司。小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素 1 β (IL-1 β) 试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司。13 种纯品 Amadori 化合物（Fru-Asp、Fru-Glu、Fru-Ser、Fru-His、Fru-Gly、Fru-Thr、Fru-Arg、Fru-Ala、Fru-Val、Fru-Met、Fru-Phe、Fru-Leu、Fru-Pro）由本实验室自制。

2.1.2 实验动物

70 只 SPF 级 KM 小鼠，体重 18 g-22 g，雌雄各半，购自斯贝福（苏州）生物技术有限公司（苏州，中国）。该小鼠实验方案已获江南大学实验动物管理与动物福利伦理委员会批准（编号：JN. No.20220430k0661130[139]）。所有动物程序都遵守国家、国际动物实验伦理原则。实验前小鼠在环境温度为 20°C-26°C、相对湿度为 40%-70%、以 12 h 的光暗循环（光照 8: 00-20: 00）的实验动物中心屏障环境内适应性饲养 7 d。

2.1.3 仪器与amp;设备

榨汁机，JYL-C50T 型，广东美的集团股份有限公司；高速冷冻离心机，CenLee 16R 型，湖南湘立科学仪器有限公司；紫外可见分光光度计，UV-2802 型，上海尤尼柯仪器有限公司；酶标仪，美国 Molecular Devices 公司；超声波清洗器，KQ-100E 型，上海精密仪器仪表有限公司；超高效液相色谱串联四级杆质谱联用仪，美国 Waters 公司；旋转蒸发仪，RV8 型，德国 IKA 公司；恒流泵，HL-2S 型，上海沪西分析仪器厂有限公司；全自动组分收集器，BSZ-100 型，上海沪西分析仪器厂有限公司；400MHz 核磁共振波谱仪，AduanceIII 型，德国布鲁克有限公司；多用途水浴恒温振荡器，上海一恒科技有限公司；水分活度仪，FA-ST 型，法国 GBX 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 梨膏营养成分检测

2.2.1.1 梨膏的制备过程

梨膏通过如下工艺进行处理：原材料验收→清洗→破碎和压榨→过滤→浓缩→成品。梨清水洗净，去除病、虫、烂、害等不可食部分，削皮切块，用榨汁机破碎榨汁，榨好用 100 目尼龙纱布过滤，再 5000 rpm 离心 15 min 得到梨汁。准确量取 100 mL 梨汁置于 150 mL 圆底烧瓶，在 100 mbar 的真空下，使用旋转蒸发仪在 90°C 下加热浓缩 20 min-120 min。完成操作后将样品适当稀释，4°C 冷藏备用。

2.2.1.2 水分含量的测定

测定梨膏中水分含量，将后续检测到的营养物质的含量换算为干重。方法为分别称取样品 2 g 左右（各 3 份），在 105°C 鼓风干燥箱中烘干 4 h，取出称量，继续烘干 1 h 至样品恒重。样品烘干前质量与恒重后质量的差即为样品中所含水分的的质量，水分质量与与烘干前质量的比值即为水分含量（%）。

2.2.1.3 褐变度的测定

参照 GB/T18963-2012《浓缩苹果汁》方法^[76]，以去离子水作空白对照，在 440 nm 处测量梨膏稀释样品的褐变强度。

2.2.1.4 总酚的测定

采用 Folin-Ciocalteu 比色法测定梨膏样品中总酚含量^[77]，并以没食子酸为标准品。标准曲线的制作：分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mL 没食子酸标准溶液（0.1 mg/mL）于 10 mL 的容量瓶中，加去离子水至 1 mL，摇匀后加入 0.5 mL 福林酚试剂，静置 1 min 后，加入 1.5 mL 20%碳酸钠溶液（w/v）然后用去离子水定容，摇匀后于室温下避光 1 h，于 760 nm 下测吸光值，绘制标准曲线。

标准曲线公式： $y=5.1771x+0.0643$ ， $R^2=0.9915$ 。

y—标准品在 760 nm 下测得的吸光度；

x—标准品的浓度，g/L。

样品的测定：准确称取梨膏稀释液 1 mL，按照上述方法测定 760 nm 处吸光值。平行测定 3 次。结果代入标准曲线得出梨膏稀释液总酚浓度。

2.2.1.5 黄酮的测定

总黄酮测定采用氯化铝比色法^[40]，标准品为芦丁。标准曲线的制作：准确吸取 0、1、2、3、4、5 mL 芦丁标准品溶液（0.1 mg/mL）分别置于 10 mL 比色管中，加入 0.3 mL

的 5%亚硝酸钠(v/w)混匀,反应 5 min 后,将 0.3 mL 的 10%氯化铝(w/v)添加到试管中,反应 6 min。然后,加入 4 mL 1 mol/L 氢氧化钠混合均匀,补足去离子水至终体积为 10 mL。混合物在室温下反应 12 min,在 510 nm 处测溶液的吸光度,绘制标准曲线。

标准曲线公式: $y=1.1558x+0.0038$, $R^2=0.9995$ 。

y—标准品在 510 nm 下测得的吸光度;

x—标准品的浓度, g/L。

样品的测定:准确称取梨膏稀释液 1 mL,按上述方法测定 510 nm 处吸光值。平行测定 3 次。结果代入标准曲线得出梨膏稀释液黄酮浓度。

2.2.1.6 蛋白质的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定梨膏中的可溶性蛋白。蛋白液配制成 6 个不同浓度,加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂,将试管摇匀,放置 3 min。在 595 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线。

标准曲线公式: $y=0.0052x+0.8657$, $R^2=0.9939$

y—标准品在 595 nm 下测得的吸光度;

x—标准品的浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

梨膏的测定:吸取梨膏稀释液 1 mL,按上述方法测定在 595 nm 处吸光值,得出可溶性蛋白浓度。

2.2.1.7 维生素 C 的测定

采用 2, 6-二氯靛酚钠法测定了梨膏中的维生素 C 含量^[78]。

2.2.1.8 还原糖的测定

还原糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[79]。分别精密吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 葡萄糖标准溶液(2 g/L),补足去离子水至 1 mL 后,加入 2 mL DNS 试剂,随后沸水浴反应 2 min 进行显色。反应后取出冷却,再补足去离子水至最终体积为 10 mL,在 540 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线。

标准曲线公式: $y=5.8567x-0.0438$, $R^2=0.9991$

y—标准品在 540 nm 下测得的吸光度;

x—标准品的浓度, g/L。

梨膏的测定:吸取梨膏稀释液 1 mL,加入 DNS 试剂 2 mL,按上述方法测定在 540 nm 处吸光值,得出梨膏还原糖含量。

2.2.1.9 游离氨基酸的测定

采用氨基酸分析仪测定梨汁中游离氨基酸的含量及种类^[80],梨汁用三氯乙酸稀释至浓度为 5% (v/v),再进行检测。

2.2.2 Fru-Asp 的制备与结构鉴定

2.2.2.1 Fru-Asp 化合物的合成

在水相体系中制备 Fru-Asp^[81], Asp-K (单羧基, 1.7120 g, 0.01 mol) 和葡萄糖 (3.6007 g, 0.02 mol) 分别称重, 然后加入 40 mL 超纯水搅拌至完全溶解。用 6 mol/L 的氢氧化钠溶液将上述溶液 pH 调制到 7.4, 再转移到 100 mL 圆底烧瓶中, 使用旋转蒸发仪在 100 mbar 的减压条件下以 90°C 加热 60 min。最后, 溶液立即在冰水中冷却, 并用 40 mL 的超纯水重新溶解。

2.2.2.2 Fru-Asp 化合物的纯化

Fru-Asp 的纯化采用 Zhou 等人^[82]的方法, 并进行了一些修改。采用 Dowex 50WX4 氢型离子交换树脂从反应后的混合物中分离出 Fru-Asp。调节进样速率和出样速率后, 首先用 1 L 去离子水洗脱, 使溶液中的葡萄糖、氨基酸、Fru-Asp、美拉德后期产物与树脂进行交换, 弃去残留的反应底物葡萄糖, 然后用 0.2 mol/L 氨水进行洗脱, 并用 TTC (2,3,5-三苯基氯化四氮唑) 进行测试, 收集 TTC 阳性反应组分, 每 10 mL 洗脱液收集在一个离心管中。

采用液相色谱-蒸发光检测器 (HPLC/ELSD) 进一步分析收集的组分。其中, HPLC-ELSD 的液相条件参考了李硕的方法^[39]。通过与 Asp 标准品的出峰时间比较, 判断 Fru-Asp 的出峰时间, 合并只含有 Fru-Asp 的洗脱液, 通过真空冷冻干燥去除多余的水及氨, 得到白色粉末, 计算 Fru-Asp 得率。

纯化后 Fru-Asp 得率的计算公式如下:

$$\text{Amadori 化合物得率} = \frac{\text{纯化后所得 Amadori 化合物摩尔量}}{\text{氨基酸原料初始摩尔量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2.3 Fru-Asp 的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

将纯化后的 Fru-Asp 配置成 0.01 mg/ml 浓度的溶液, 并用 UPLC-Q-TOF-MS 进一步鉴定。液相色谱柱为 BEH C₁₈ (1.6 μm, 2.1×150 mm), 流动相 A 是乙腈, B 是 0.1% 的甲酸水溶液。质谱采用 ESI+ 正离子电离模式, 具体参数参考周仁杰的方法^[83]。使用 MassLynx 软件对数据进行分析处理。

2.2.2.4 Fru-Asp 化合物的 NMR 分析

将制备的 Fru-Asp 纯品 (20 mg) 溶解在 500 μL 的氘水中。在 298 K 和 400 MHz 条件下, 使用核磁共振波谱仪得到 ¹H NMR 谱, 在 298 K 和 101 MHz 条件下得到 ¹³C NMR 谱。数据使用 MestReNova 软件 (版本 14.0.0) 进行分析。

2.2.3 Fru-Asp 功能性研究

2.2.3.1 抗氧化活性的测定

测定 Fru-Asp (0-10 mg/mL) 的抗氧化能力, 并与梨膏中其他种类的 Amadori 化合物的抗氧化性进行比较。

(1) DPPH 自由基清除能力的测定

参照 Herald 等人^[84]的方法并进行适当修改, 将 25 μL 乙醇/样品与 200 μL 新鲜制备的 0.35 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液混合, 室温下避光放置 2 h。用乙醇溶液作空白, 通过酶标仪测定 517 nm 处的吸光度。另外将 25 μL 样品与 200 μL 乙醇混合, 在 517 nm 处测吸光度。用抗坏血酸 (AA) 作标准曲线, DPPH 自由基清除能力表示为 $\mu\text{mol AAE/L}$ 样品。

(2) ABTS 自由基清除能力的测定

ABTS 自由基清除能力根据 Sant'Anna 等人^[85]所述的方法, 并略有修改。制备 ABTS 自由基溶液, 将 0.1 mL 样品与 3.9 mL 反应液混合, 室温下避光放置 30 min, 随后在波长 735 nm 处测定吸光值。用抗坏血酸 (AA) 作标准曲线, ABTS 自由基清除能力以 $\mu\text{mol AAE/L}$ 样品表示。

(3) Fe^{3+} 还原能力的测定

按照卢引的方法测定 Fe^{3+} 还原能力^[86]。FRAP 试剂: 配置 300 mmol/L 醋酸盐缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液和 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 将上述 3 种溶液以 10:1:1 的比例混合 (缓冲液:TPTZ: Fe^{3+})。将 10 μL 标准品/样品/空白样品加入 96 孔板中, 向所有孔中加 300 μL FRAP 试剂, 然后在室温下反应 2 h。在 593 nm 处测定吸光度。用抗坏血酸 (AA) 作标准曲线, Fe^{3+} 还原能力表示为抗坏血酸当量 (AAE), 单位为 $\mu\text{mol AAE/L}$ 样品。

(4) 氧化自由基吸收能力的测定

ORAC 测定根据 Prior 等人^[87]的方法。在 96 孔板中加入 50 μL 样品和 150 μL 荧光素工作溶液 (86.8 nmol/L), 然后在 37°C 下保温 30 min, 使平板平衡。随后, 向每个孔中加入 25 μL AAPH 溶液 (153 mmol/L), 使反应开始, 96 孔板放入酶标仪中振荡 10 s, 进行荧光强度测量。每隔 1 min 测量一次荧光值, 荧光强度分别记录为 $f_1, f_2, f_3, f_4, \dots, f_{120}$, 用 Trolox 作标准曲线, ORAC 值以 $\mu\text{mol Trolox/L}$ 样品表示。样品的 AUC 计算公式为:

$$\text{AUC} = \left(0.5 \times \frac{f_1}{f_1} + \frac{f_2}{f_1} + \frac{f_3}{f_1} + \dots + \frac{f_i}{f_1} + \dots + \frac{f_{119}}{f_1} + 0.5 \times \frac{f_{120}}{f_1} \right) \times 2.5 \quad (2)$$

$$\Delta\text{AUC} = \text{AUC}_{\text{样品}} - \text{AUC}_{\text{空白}} \quad (3)$$

2.2.3.2 ACE 抑制活性的检测

根据 Yu 等人的方法, 利用自动生化分析仪进行分析^[38]。将 ACE (12.5 mU) 与

Fru-Asp (0-2 mmol/L) 在 37°C 下孵育 20 min, 去离子水作为空白, 测得与不同浓度 Fru-Asp 混合后溶液中残余的 ACE 酶活性。IC₅₀ 值表示产生 50% ACE 活性抑制的样品浓度, 通过 S 曲线拟合计算得到, 由 GraphPad Prism 9 计算。

2.2.3.3 止咳实验

采取符冰等人^[88]的方法进行小鼠氨水引咳试验。将小鼠置于一个倒置的玻璃烧杯中, 暴露于 0.1 mL 25% 的氨水中 45 s。由一名训练有素的实验人员观察并记录潜伏期 (从氨水刺激到开始咳嗽的时间) 和 2 min 内的咳嗽次数。选取 40 只小鼠, 随机分为 4 组, 每组 10 只。组 1 (空白组) 灌胃 0.9% 生理盐水, 组 2 (阳性药物组) 灌胃 30 mg/kg 氢溴酸右美沙芬片, 组 3 和组 4 分别灌胃 50 和 250 mg/kg Fru-Asp, Fru-Asp 为 2.2.2 中纯化、结构鉴定后的纯品。

梨膏平均推荐剂量 (按 60 kg 成年人体重计算) 是 40 g/d, 小鼠剂量相当于 6 g/(kg m_b · d)。通过工艺优化, 实验室自制梨膏 Fru-Asp 超过 0.8%, 因此, Fru-Asp 剂量设置为 50 mg/(kg m_b · d) 和 250 mg/(kg m_b · d)。按 20 mL/kg (0.4 mL/20 g) 进行灌胃给药, 每天一次, 连续 5 天。末次给药 1 h 后, 观察并记录咳嗽潜伏期和 2 min 内咳嗽次数。同一只小鼠给药前后的潜伏期和咳嗽次数都进行记录, 以差值表示咳嗽潜伏期的延长, 咳嗽次数降低率用百分比来表示。计算公式如下:

$$\text{潜伏期延长时间 (s)} = T_{\text{给药后}} - T_{\text{给药前}} \quad (4)$$

式中 $T_{\text{给药后}}$ 为小鼠给药后咳嗽潜伏期, $T_{\text{给药前}}$ 为小鼠给药前咳嗽潜伏期。

$$\text{咳嗽次数降低率 (\%)} = (n_1 - n_2) / n_1 \quad (5)$$

式中 n_1 为小鼠给药前 2 min 内咳嗽次数, n_2 为小鼠给药后 2 min 内咳嗽次数。

2.2.3.4 脂多糖诱导小鼠急性肺损伤实验

50 只小鼠随机分为 5 组: 空白组、LPS 模型组、Fru-Asp 低剂量和高剂量组 (剂量与 2.2.3.3 中的组 3 和组 4 相同)、阳性药物组 (1 mg/(kg m_b) 地塞米松), 每组 10 只小鼠。Fru-Asp 组灌胃给药不同剂量的 Fru-Asp, 其他组灌胃等体积的生理盐水, 灌胃给药 10 d。第 11d, 阳性药物组腹腔注射地塞米松, Fru-Asp 低剂量和高剂量组分别腹腔注射 50 和 250 mg/kg Fru-Asp, 其余组腹腔注射相同体积的生理盐水。1 h 后, 除空白组外, 各组均腹腔注射 LPS (10 mg/kg m_b)。造模方法和剂量的选择是按照 An 等人^[89]的研究进行的。

造模 6 h 后, 用异氟烷麻醉小鼠并处死, 暴露胸腔腹腔, 观察肺组织外观改变, 结扎右主支气管, 少量多次用 PBS 缓冲液缓慢冲洗左侧肺, 得到支气管肺泡灌洗液 (BALF)^[90], 置于离心管, 回收率超过 80%, 离心后取上清液于 -80°C 保存; 摘下右侧肺上叶置于 4% 多聚甲醛固定液固定, 制备石蜡切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肺组织病理形态; 采用 BCA 试剂盒测定 BALF 中蛋白浓度, 采用 ELISA 试剂

盒测定 BALF 中 TNF- α 和 IL-1 β 的浓度, 将余右肺吸干, 称重, 然后在 60°C 的烘箱中放置 72 h, 以获得干重, 计算肺湿重/干重 (W/D) 比。

2.2.4 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺检测方法的建立

2.2.4.1 样品中 Amadori 化合物的提取

50 mL 梨膏样品先在室温下超声提取 20 min, 再转移到离心管中, 在 5000 rpm 条件下离心 15 min, 取上清液待检测。过于粘稠的样品先稀释一定倍数, 并充分溶解, 再进行提取。

2.2.4.2 建立 13 种 Amadori 化合物的检测方法

在课题组前期合成 12 种 Amadori 化合物基础上, 建立 13 种 Amadori 化合物的检测方法。合成的 13 种 Amadori 化合物的化学分子式和相对分子质量如表 2-1 所示, Amadori 化合物纯品纯度在 95% 以上 (HPLC-MS), 经质谱和 NMR 分析确定结构, 与报道的数据相一致^[38,39]。

表 2-1 13 种 Amadori 化合物的分子式和相对分子质量

Tab. 2-1 Molecular formulas and molecular weights of 13 Amadori compounds

Amadori 化合物	分子式	相对分子质量
Fru-Asp	C ₁₀ H ₁₇ NO ₉	295
Fru-Ala	C ₉ H ₁₇ NO ₇	251
Fru-Leu	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	293
Fru-Val	C ₁₁ H ₂₁ NO ₇	279
Fru-Phe	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	327
Fru-Ser	C ₉ H ₁₇ NO ₈	267
Fru-Thr	C ₁₀ H ₁₉ NO ₈	281
Fru-Met	C ₁₁ H ₂₁ NO ₇ S	311
Fru-Glu	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉	309
Fru-Arg	C ₁₂ H ₂₄ N ₄ O ₇	336
Fru-His	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₇	317
Fru-Pro	C ₁₁ H ₁₉ NO ₇	277
Fru-Gly	C ₈ H ₁₅ NO ₇	237

分别准确称量 13 种 Amadori 化合物的标准品, 配置成一定浓度梯度的 Amadori 化合物混合标准液 (8 ppm、4 ppm、2 ppm、1 ppm、0.5 ppm、0.25 ppm、0.125 ppm、

0.0625 ppm), 并于-20°C冰箱中保存。

根据李硕等人的检测方法建立 UPLC-MS/MS 测定 13 种 Amadori 化合物的方法并作少量修改^[39]。样品先用 13 mm*0.22 μm 水系滤膜进行过滤处理, 进样 1 μL。色谱柱采用 ACQUITY C₁₈ (1.7 μm, 2.1×50 mm); 流动相: A 相是 100%乙腈, B 相是 0.1%甲酸水 (v/v), 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序如下: 0 min, B 相 100%; 1 min-5 min, B 相 100%变为 90%; 5 min-6 min, B 相 90%变为 50%; 6 min-7 min, B 相 50%变为 20%; 7 min-9 min, B 相 20%; 9 min-9.5 min, B 相 20%变为 100%; 9.5 min-10 min, B 相 100%, 共 10 min。

质谱条件为 ESI+模式; 离子源温度: 120°C; 碰撞能量: 20 V; 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气 (N₂) 温度: 400°C; 脱溶剂气流量: 800 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h; 质量范围: 100 m/z~400 m/z; 检测电压: 1800 V。优化后的质谱参数如表 2-2 所示。

表 2-2 Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺的质谱参数

Tab. 2-2 MS parameters of Amadori compounds, 5-HMF and Acrylamide

成分	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)
Fru-Asp	20	10	296	296 → 278
Fru-Gly	15	10	238	238 → 220
Fru-Ala	15	15	252	252 → 234
Fru-Ser	17	13	268	268 → 250
Fru-Pro	25	10	278	278 → 260
Fru-Val	18	22	280	280 → 216
Fru-Thr	17	13	282	282 → 264
Fru-Leu	15	20	294	294 → 230
Fru-Glu	15	20	310	310 → 148
Fru-Met	15	10	312	312 → 294
Fru-His	20	16	318	318 → 190
Fru-Phe	18	16	328	328 → 292
Fru-Arg	30	20	337	337 → 114
5-HMF	30	13	127	127 → 109
丙烯酰胺	22	15	72	72 → 55

从检测限、定量限、精密度和回收率等方面对检测方法进行方法学验证。Mass Lynx 软件进行数据处理和分析。

2.2.4.3 建立 5-HMF 和丙烯酰胺检测的方法

准确称量 5-HMF 和丙烯酰胺标准品，配置成一定浓度梯度的混合标准液（10 ppm、5 ppm、2.5 ppm、1.25 ppm、0.625 ppm、0.3125 ppm、0.15625 ppm），并于-20℃冰箱中保存备用。

同样使用 UPLC-MS/MS 进行定性定量。流动相：A 相 100%乙腈，B 相 0.1%甲酸水（v/v）；梯度洗脱程序：0 min-1 min，100%B；1 min-5 min，100%-50%B；5 min-10 min，50%-0%B；10 min-12 min，0%-100%B；12 min-15 min，100%B；MS/MS 质量范围为 100-200 m/z，质谱的其他参数与检测 Amadori 化合物的质谱参数相同。

2.2.5 梨膏制备工艺的优化

2.2.5.1 原料预处理

将砀山梨用清水清洗后，去皮去核，切成小块，迅速放入榨汁机榨汁，再用 100 目尼龙纱布过滤，除去梨渣，将过滤后的梨汁在 5000 rpm 下离心 15 min，取上清液。

2.2.5.2 水分活度的测定

取适量样品填充到样品皿中，放到测量腔室中，合上仪器开始测量，平行测 3 次。

2.2.5.3 水分活度的调节

梨汁用电磁炉加热，每隔 10 min 取出，测定水分含量，加热时间不同，水分蒸发程度不同，即可得到不同水分活度的梨膏半成品。分别准确称取 3 份 5 g 不同水分活度的梨膏于耐压瓶中，瓶口密封，保证水分不流失也不渗入，在温度为 90℃的水浴锅中保温 5 h，研究水分活度在 0.944、0.899、0.810、0.747、0.666 时对样品中 Amadori 化合物和 5-HMF 含量的影响。

2.2.5.4 保温温度的调节

准确称取 3 份 5 g 水分活度为 0.666 的梨膏，装入玻璃瓶中，瓶口密封，保证水分不流失也不渗入，保温时间 5 h，研究保温温度在 60℃、70℃、80℃、90℃、100℃时样品中 Amadori 化合物和 5-HMF 含量的变化。

2.2.5.5 保温时间的调节

准确称取 3 份 5 g 水分活度为 0.666 的梨膏，装入玻璃瓶中，瓶口密封，保证水分不流失也不渗入，保温温度 90℃，研究保温时间在 2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 时样品中 Amadori 化合物和 5-HMF 含量的变化。

2.2.5.6 工艺优化正交试验设计

在单因素实验结果的基础上，以 13 种 Amadori 化合物含量为指标，以水分活度

(A)、保温温度 (B)、保温时间 (C) 为调控因素, 通过三因素三水平正交试验, 筛选出最优的条件。

表 2-3 正交试验表

Tab. 2-3 The orthogonal experiments

水平	A	B	C
	水分活度	保温温度 (°C)	保温时间 (h)
1	0.810	85	3
2	0.747	90	4
3	0.706	95	5

2.2.5.7 验证实验

为验证优化条件的可行性, 以 5 kg 梨为原料, 在最优加工条件下制备梨膏, 进行三次放大实验, 并测定 Amadori 化合物和 5-HMF 含量。

2.2.6 成分检测与性质分析

2.2.6.1 梨膏营养成分检测

水分、总酚、黄酮含量的测定按 2.2.1 中进行。

Amadori 化合物、5-HMF 和丙烯酰胺检测: 按 2.2.4 的方法提取梨膏, 稀释合适的倍数后, UPLC-MS/MS 法测定, 结果以干重计。

2.2.6.2 梨膏抗氧化性检测

抗氧化性测定按 2.2.3.1 中进行, 测定结果表示为 $\mu\text{g/g}$ 梨膏。

2.2.6.3 梨膏感官评定

梨膏的感官评定参考杨冰峰等人^[40]的方法。在正式实验前进行评审员的培训和筛选, 最终选出 15 名评审员。具体评判标准见表 2-4。评定前取梨膏 10 g, 加入温水 50 mL 进行冲泡, 稀释后的梨汁进行口感评分, 色泽、气味、组织状态直接通过观察梨膏来评分。

表 2-4 梨膏感官评定标准

Tab. 2-4 Sensory evaluation criteria for pear syrup

项目	标准	得分
色泽 (25分)	呈亮黄色, 有光泽	21-25
	呈棕黄色, 稍有光泽	11-20

续表 2-4 梨膏感官评定标准

Continued Tab. 2-4 Sensory evaluation criteria for pear syrup

项目	标准	得分
色泽 (25分)	呈暗褐色, 没有光泽	0-10
气味 (25分)	具有梨果特有香气, 香气浓郁	21-25
	具有梨果特有香气, 香气稍淡	11-20
	不具有梨果特有香气, 或有其他不良气味, 如焦糊味	0-10
组织状态 (25分)	呈半流体状态, 粘稠	21-25
	呈半流体状态, 较粘稠	11-20
	呈流体状态或流动性太差, 呈固态	0-10
口感 (25分)	具有梨果甜香味, 无异味, 酸甜可口	21-25
	具有梨果甜香味, 偏酸或偏甜	11-20
	无梨果甜香味, 有异味, 过酸或过甜	0-10

2.2.6.4 梨膏止咳祛痰实验

止咳实验按 2.2.3.3 中方法进行。将 18 只小鼠分成 3 组: 空白组 (生理盐水)、阳性药物组 (30 mg/kg 氢溴酸右美沙芬片)、自制梨膏组 (6 g/kg), 每组 6 只, 按 20 mL/kg (0.4 mL/20 g) 进行灌胃给药, 连续 5 d。末次给药后 1 h, 观察并记录小鼠从氨水刺激到开始咳嗽的咳嗽潜伏期和 2 min 内咳嗽次数。

参照符冰等人^[88]的方法, 将 18 只小鼠进行酚红排泌祛痰实验, 分成 3 组, 即空白组 (生理盐水)、阳性药物组 (100 mg/kg 氯化铵片)、自制梨膏组 (6 g/kg), 每组 6 只, 按 20 mL/kg (0.4 mL/20 g) 进行灌胃给药, 连续 6 d。第 6d 给药 0.5 h 后, 腹腔注射酚红溶液 (0.05%), 每只小鼠注射 0.2 mL, 0.5 h 后处死, 分离气管, 与周围组织剥离, 取一段气管放入试管, 试管中依次加入 0.1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液、2 mL 9.9% 氯化钠溶液, 振荡, 取上清液, 测量在 546 nm 处吸光值。

配置 0、2.5、3、3.5、4、4.5、5 $\mu\text{g/mL}$ 的酚红溶液, 测定 546 nm 处吸光值, 制备酚红标准曲线, 标准曲线方程 $y=0.0242x+0.037$, $R^2=0.9931$ 。将样品吸光值代入曲线计算酚红排泌量 ($\mu\text{g/mL}$)。

2.2.7 数据分析

进行 3 次重复实验, 实验结果表示为平均值 \pm 标准偏差 (SD)。使用 SPSS 26. 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 采用 Duncan 多范围检验。采用 GraphPad Prism 9. 软件进行作图。MassLynx V4.2 软件用于 UPLC-MS/MS 数据的采集和分析。

3 结果与讨论

3.1 梨膏营养成分检测与功能性分析

3.1.1 梨汁中的营养成分

由表 3-1 可以看出, 梨汁中含有丰富的营养物质, 其中还原糖含量最多, 为 73.75 ± 0.79 g/100 g, 这与赵辛等人^[91]的研究一致。梨中还含有多酚类物质, 包括总酚和黄酮类, 总酚含量为 134.32 ± 4.75 mg GAE/100 g, 黄酮含量为 59.35 ± 0.76 mg RE/100 g, 多酚成分具有显著的抗氧化和抗炎症等生理功能, 对梨膏中多酚类成分进行检测具有十分重要的理论价值。梨汁中还含有可溶性蛋白和少量 Amadori 化合物, 可溶性蛋白含量为 154.51 ± 8.25 mg BSA/100 g, 说明榨汁过程可能发生了非酶促褐变。为了进一步探究梨膏加工过程的美拉德反应, 对梨汁中的氨基酸种类和含量进行了测定。

表 3-1 梨汁中主要营养成分的含量。

Tab. 3-1 Concentrations of main chemical components of pear juice.

营养成分	含量
还原糖 (g/100 g DW)	73.75 ± 0.79
可溶性蛋白 (mg BSA/100 g DW)	154.51 ± 8.25
总酚 (mg GAE/100 g DW)	134.32 ± 4.75
黄酮 (mg RE/100 g DW)	59.35 ± 0.76
维生素 C (mg /100 g DW)	175.48 ± 30.54
Amadori 化合物 (mg /100 g DW)	4.75 ± 0.16

注: DW 表示干重。

由表 3-2 可知, 梨汁中游离氨基酸种类齐全, 总量为 131.79 mg/100 g, 其中 Asp 含量最高, 含量为 95.36 mg/100 g, 占总氨基酸含量约 72.4%, 其次是 Glu、Pro、Val, 天冬氨酸含量是其他氨基酸含量的十倍以上, 结果与刘振艳等人^[92]的研究一致。因此要尤其关注加工过程 Asp 参与的美拉德反应。

表 3-2 梨汁中的氨基酸组成及含量

Tab. 3-2 Composition and content of Amino Acids in pear juice

氨基酸	含量 (mg/100 g)
Asp	95.36 ± 2.03^a
Glu	6.99 ± 0.09^b
Ser	2.44 ± 0.07^{de}
His	1.39 ± 0.02^f
Gly	1.28 ± 0.04^f
Thr	2.53 ± 0.04^d

续表 3-2 梨汁中的氨基酸组成及含量

Continued Tab. 3-2 Composition and content of Amino Acids in pear juice

氨基酸	含量 (mg/100 g)
Arg	1.02±0.02 ^f
Ala	2.87±0.09 ^d
Tyr	1.00±0.01 ^f
Cys-s	0.05±0.00 ^g
Val	4.72±0.03 ^c
Met	1.13±0.01 ^f
Phe	1.15±0.00 ^f
Ile	1.35±0.01 ^f
Leu	1.58±0.10 ^{ef}
Lys	1.61±0.02 ^{ef}
Pro	5.31±0.07 ^c
总量	131.79±1.85

注：同一列中不同字母表示样品之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.1.2 梨汁浓缩过程营养成分变化

从图 3-1 可以看出，浓缩过程中还原糖含量先增加后下降，由原梨汁 73.75 ± 0.79 g/100 g DW 降至 24.7 ± 2.27 g/100 g DW，还原糖含量在前 20 min 增加，分析原因可能是热处理使梨的细胞遭到破坏，可溶性糖析出，此外，多糖也会水解为单糖，从而提高梨汁中还原糖的含量。20 min 之后，还原糖参加美拉德反应，反应速率高于还原糖生成速率，使得梨汁中还原糖的含量整体降低。

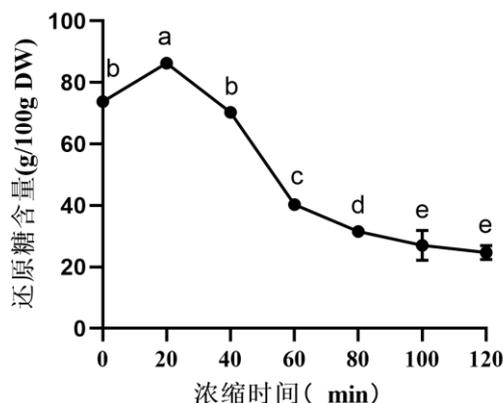


图 3-1 梨膏浓缩过程还原糖的变化

Fig. 3-1 Changes of reducing sugar of pear syrup during the concentration process

注：不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

随着加热浓缩时间增加，从图 3-2 可以看出，可溶性蛋白含量前 20 min 显著下降，从 154.51 ± 8.25 mg BSA/100 g DW 降至 23.72 ± 5.63 mg BSA/100 g DW，20 min 之后含量缓慢下降，变化幅度不大。蛋白含量下降说明热处理使部分蛋白质水解，生成肽链

和游离氨基酸，导致含量下降。同时生成的游离氨基酸可与还原糖发生美拉德反应，因此可以进一步探究美拉德产物对梨膏的有益作用。

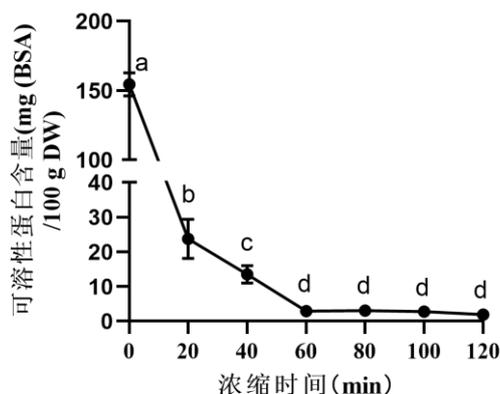


图 3-2 梨膏浓缩过程蛋白质的变化

Fig. 3-2 Changes of protein of pear syrup during the concentration process

注：不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

由图 3-3、3-4 可知，黄酮和维 C 含量在加工过程中呈下降趋势。维 C 含量从 175.48 ± 30.54 mg /100 g DW 下降到 6.99 ± 0.27 mg /100 g DW，下降率达 96.02%，黄酮含量从 59.35 ± 0.76 mg RE/100 g DW 下降到 41.90 ± 0.00 mg RE/100 g DW。因为黄酮和维 C 极易氧化分解^[93]，黄酮上的酚羟基等结构十分不稳定^[94]，维 C 是六碳多羟基酸性化合物，在常态下不太稳定，易被氧化，所以加热过程黄酮和维 C 含量下降。可以推断，维 C 与黄酮不是梨膏有益作用增强的因素。

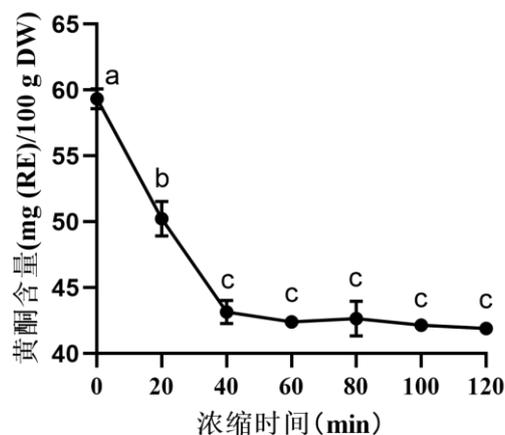


图 3-3 梨膏浓缩过程黄酮的变化

Fig. 3-3 Changes of flavone of pear syrup during the concentration process

注：不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

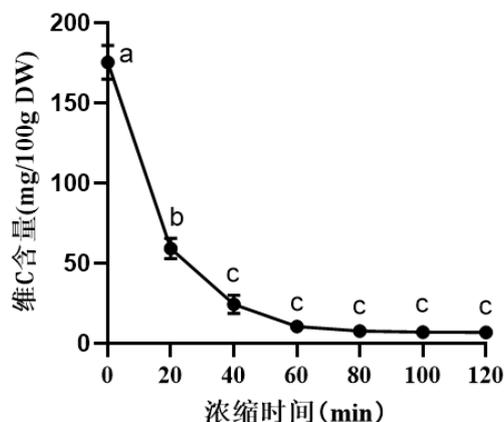


图 3-4 梨膏浓缩过程维 C 的变化

Fig. 3-4 Changes of vitamin C of pear syrup during the concentration process

注：不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

根据图 3-5，浓缩 20 min 后，总酚含量显著降低，从 134.32 ± 4.75 mg GAE/100 g DW 下降到 50.24 ± 1.32 mg GAE/100 g DW，可能是因为梨皮中含有丰富的多酚类物质，梨汁经过过滤后，部分酚类物质残留于滤渣中，这与董雪君等人^[16]的研究结果一致。浓缩 20 min 后，总酚含量缓慢增加，增加幅度很小，这可以解释为加热使多酚氧化酶高温失活，阻碍了多酚类物质的氧化，同时一些不溶性酚转变为可溶性酚^[95]，溶出到梨膏中，使产品多酚含量提高。

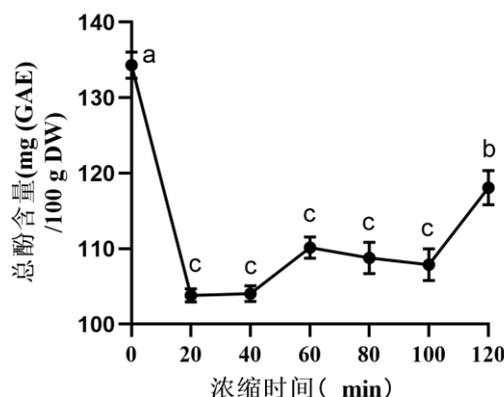


图 3-5 梨膏浓缩过程总酚的变化

Fig. 3-5 Changes of total phenol of pear syrup during the concentration process

注：不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

如图 3-6、3-7 所示，随着梨膏加热浓缩时间的延长，Amadori 化合物和 5-HMF 的含量显著增加。13 种 Amadori 化合物的总量从 4.75 ± 0.16 提高到 639.74 ± 39.72 mg/100 g DW。5-HMF 在原梨汁中未检出，之后含量从 0.00 ± 0.00 增加到 1.55 ± 0.02 mg/100 g

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/566205155044010053>